

実験的ハムスター舌癌形成過程の超微形態学的研究

II. 前癌期における角化形態の変化について

小田島哲世 賀来 亨 森 道夫

札幌医科大学病理学第2講座 (主任 小野江為則教授)

Ultrastructural Study on Experimental Lingual Carcinogenesis in the Hamster

II. Ultrastructural Study of Premalignant Lesions with an Emphasis on Abnormal Keratinization

Tetsuyo ODAJIMA, Tohru KAKU
and Michio MORI

Department of Pathology (Section 2), Sapporo Medical College
(Chief: Prof. T. Onoé)

An ultrastructural study of hamster lingual epithelium after the application of 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene (DMBA) was performed, with an emphasis on abnormal keratinization. In the initial stages, no sign of abnormal keratinization was seen. In the stages of diffuse and papillomatous epithelial proliferation, dilatation of intercellular spaces with a decrease in the number of desmosomes was seen. Nuclear changes associated with the increase in the number of ribosomes in the cytoplasm were also observed. These features were most conspicuous in papillomas. Abnormal keratinization such as hyperkeratosis, parakeratosis, acantholysis and dyskeratosis was noted. In the areas of diffuse epithelial proliferation, hyperkeratosis was well observed, while in papillomas parakeratosis and dyskeratosis were predominant. Two types of dyskeratosis were noticed; an aggregation of tonofibrils around the nucleus like the "crown of thorn-like pattern" reported by Setälä et al., individual cell keratinization accompanied with acantholysis. The cell membrane of the latter dyskeratotic cell was always thickened. In papillomas, an increase in the number of keratinosomes was seen, but they were diffusely distributed throughout the cytoplasm. On the other hand, the number of keratohyalin granules in the cells of papillomas was markedly reduced and the inner structure of them was greatly simplified.

These results suggested that the disturbance of maturation in the keratinocytes occurred in papillomas.

(Received July 18, 1978 and accepted September 5, 1978)

1 緒 言

われわれの教室では、主に 3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene によって誘発されたラット肝癌形成過程の研究が系統的に続けられている。肝癌の形成に至る過程では、肝細胞の分化した特異機能の喪失、分化の混乱が認められ、前癌状態の把握や発癌過程の解析に必要な重要な所見が得られている^{1~6)}。

今回われわれが対象とした重層扁平上皮は、肝細胞ほどの分化のマーカーとなる形質には乏しいが、本質的には同様の変化が重層扁平上皮の発癌過程においても生ずることが予測される。そこで keratinocyte の角化という機能に注目して、発癌過程において角化形態にいかなる変化が生

ずるかを検討した。重層扁平上皮の発癌過程を電顕的に観察した報告は多いが^{7~12)}、角化形態の変化に注目した論文は少なく、とくに keratinosome (Ks), keratohyalin granule (KG) の変化について詳細に観察した論文はない。本研究はハムスター舌癌形成過程における超微形態の変化、とくに病的角化、Ks と KG の変化などに焦点をあてて詳細に検索することを目的としたものである。前報はその対照として正常の舌粘膜上皮の超微構造について検索したが¹³⁾、今回は実験群、すなわち舌粘膜への発癌剤塗布後の上皮の変化を電顕的に観察した。

ハムスター舌癌形成過程における肉眼ならびに組織像については、さきに報告したが^{14~16)}、多数例では、初期、慢性増生期、乳頭腫形成期、癌形成期の4期に分けること

ができ、少数例においては、瀰慢性増生期のあとで上皮の外向性発育を認めないものがあったので、これを表面増殖期とした¹⁶⁾。今回はこれらの各過程の中で、とくに癌形成期以前の病変について詳細に観察した。

2 実験方法

実験動物は生後約2カ月の雄ゴールデン・ハムスター35匹で、舌側縁中1/3部粘膜に0.5% 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene (DMBA) アセトン溶液を毎週3回塗布した。さきの実験の結果を参考に¹⁴⁻¹⁶⁾、これらの動物を経時的に断頭して病変部を摘出し、光顕、電顕試料とした。その後の操作は第1編とまったく同様の方法で¹³⁾、それぞれ光顕、電顕的に観察した。

3 結果

3.1 肉眼ならびに組織学的所見

3.1.1 初期：実験開始からはほぼ2週間目までの期間で、肉眼的に変化なく、組織学的には上皮の軽度の肥厚が認められるのみであった。

3.1.2 瀰慢性増生期 (3週～7週)：小腫瘍が形成されるまでの期間で、肉眼的に下半部寄りの粘膜が次第に白濁粗糙となった。組織学的に、はじめは舌側縁下半部の上皮が軽度の肥厚を示す程度であったが、次第に上皮突起の軽度の延長を伴い、上皮の中間層、角質層の肥厚はさらに著明となった。基底層、深部中間層では、核のクロマチンの豊富な細胞が多く、角質層においては不全角化(錯角化)も認められるようになった。これらの変化は舌側縁上半部より下半部において著明であった。

3.1.3 乳頭腫形成期ならびに表面増殖期 (6週～18週)：小腫瘍の形成初期では、小腫瘍の上皮の厚さは周辺の上皮のそれとほとんど変らなかった。上皮突起の延長も軽度で、上皮の層構造の乱れもなく、粘膜固有層の結合組織の量は上皮とバランスを保ち、単に粘膜が隆起したようにみえるにすぎなかった (Fig. 1)。その後、多数例において腫瘍が外向性に増大し、組織学的にも、増生した上皮は乳頭状発育を示した (Fig. 2)。その後、さらに乳頭状に発育した上皮の層構造が次第に乱れを生じ、細胞の軽度の異型性も認められるようになった (Fig. 3)。他方、少数例においては、上皮は外向性に発育することなく、粘膜表面に広く増殖し、さらに上皮の増殖が旺盛で、下向き増殖を示すものも認められた (Fig. 4)。

3.2 電子顕微鏡的所見

舌側縁部における病変は、糸状乳頭を有する上半部より、糸状乳頭を持たない下半部に強く認められるので、本研究の検索部位はすべて乳頭間上皮に相当する下半部の病変に

限定した。

3.2.1 初期：上皮・結合組織境界部には著変なく、わずかに lamina densa の多層化が目立つ程度であった (Fig. 5)。基底層、深部中間層の細胞では、核輪郭の軽度の不整と、細胞質における遊離リボゾームの増量を伴い、やや暗調を呈するのみで (Fig. 5)、浅部中間層、角質層においては変化はみられなかった。

3.2.2 瀰慢性増生期：瀰慢性増生期前半。上皮・結合組織境界部では anchoring fibril 様の無構造物質の増加をみる以外、とくに変化はなかった (Figs. 6, 7)。基底層、深部中間層においては、細胞間隙は著しく拡大し、そこに多数の細胞質突起がみられた (Figs. 6, 7)。しばしば細胞質の電子密度の高い暗調細胞が出現し、明瞭な核小体と比較的大きい不規則な核を伴い、遊離リボゾームをはじめ、糸粒体、Golgi 装置などの細胞小器官に富んでいた (Figs. 6, 7, 8)。また暗調細胞には、細胞質のみならず、核質も暗調を呈するものも認められた (Fig. 6)。これに対し遊離リボゾームに乏しく、核、細胞質とも明るい明調細胞も混在していた (Fig. 6)。tonofibril (Tfib) の分布、走行、発達程度は、個々の細胞によって著しく異なり、Tfib の発達が悪い細胞から、軽度に凝集した Tfib が核周囲に分布、走行した基底細胞 (Fig. 7)、深部中間層細胞 (Figs. 7, 8) などが観察された。浅部中間層、角質層になると、もはや細胞間隙の拡大は認められなかった。Ks の形態、分布状態は正常上皮の場合と変わらないが、その出現頻度はむしろ高い場合もあった (Figs. 12, 13)。Tfib の凝集像、KG の形態、分布は正常上皮のそれと大して変わらず、高電子密度の KG 様核内小体は依然として認められた。このような細胞の上層にある角質層細胞も正常に近い構造を示し、keratin filament と線維間物質から成っていた (Fig. 12)。

瀰慢性増生期後半。基底層、深部中間層における細胞の超微構造は、前半のそれと基本的には変わらないが、かつて Setälä らが crown of thorn-like pattern と呼んだ像⁷⁾、すなわち核周囲に吻合、凝集した多量の Tfib を持った細胞もしばしば観察された (Fig. 9)。この凝集した Tfib を構成する個々の線維は良く識別できた (Fig. 10)。瀰慢性増生期前半にみられる例を含め、凝集した Tfib を持つ細胞の核の性状はいずれも同様の所見を呈し、クロマチンの凝集が少なく、核小体は肥大して網状構造を示していた (Fig. 9)。深部中間層上部には、まれではあるが desmosome を欠き、肥厚した細胞膜と濃縮、変性した核、細胞質における多数の空胞と凝集した多量の Tfib などを持つ単一角化細胞も認められた (Fig. 11)。desmosome は、単一角化細胞以外の細胞ではさほど減少することはないが、その付着板に付着する Tfib は減少することが多かった (Fig. 9)。

浅部中間層、角質層における細胞の超微構造は、瀰慢性増生期前半のそれとはかなり異なっていた。KG は正常上皮にみられる型のもの以外に、凝集した Tfib と密着したやや不整形のものもみられ、KG 様核内小体は消失していた (Fig. 14)。しかし glutaraldehyde のみによる固定では、KG の内部構造は正常上皮のそれとさほど変わらず、Ks の形態、分布も瀰慢性増生期前半の場合と同様であった。角質層には多量の凝集した Tfib をいれた細胞、多量の凝集した Tfib と多数の空胞をいれた細胞 (Fig. 14)、そして核の遺残を伴った細胞などが重積していた。また角質層細胞の細胞膜は常に肥厚していた (Fig. 14)。

3・2・3 乳頭腫形成期、表面増殖期：粘膜の小隆起性病変。上皮の変化は瀰慢性増生期の後半における場合とほぼ同様であった。

比較的小さな乳頭腫。上皮・結合織境界部にさほどの変化はないが、基底層、深部中間層では、細胞間隙は拡大し、そこに多数の細胞質突起が観察された (Fig. 15)。desmosome は減少傾向を示した (Fig. 15)。核・細胞質比は大きく、核輪郭はさらに不整となり、クロマチンの凝集は少なく、核小体は明瞭で網状を呈し、細胞質には比較的多数の糸粒体、遊離リボゾームが観察され、基質の電子密度が高いため細胞全体が暗調を呈していた (Fig. 15)。Tfib は多少減少することがあったが、その異常凝集像は、程度の差こそあれ、どの細胞にも認められた。深部中間層上部では、細胞膜が深く陥入して、一個の細胞に多量の desmosome が集積する像もみられた (Fig. 16)。浅部中間層では、暗調細胞に交えて、細胞小器官に乏しく、核質も明るい大型の明調細胞が混在していた (Fig. 17)。KG は小形で、出現頻度は減少し、KG 様核内小体はまったく認められなかった。glutaraldehyde のみの固定では、KG 内部は高電子密度の基質と少数の低電子密度の円形部分とから成っていた (Fig. 18)。Ks は細胞質に多数認められたが、細胞間隙にはほとんどみられず、内部の層板構造が消失して空胞状となったものも観察された (Fig. 19)。角質層は暗調、扁平な細胞で構成され、下部には遺残変性した核、凝集した Tfib、糸粒体、遊離リボゾームをいれた細胞 (Fig. 19)、上部には多量の凝集した Tfib をいれた細胞が認められた。

比較的大きな乳頭腫。基底層、深部中間層の細胞の超微構造は、小乳頭腫の場合と基本的に変わらないが、Tfib の量が比較的減少した細胞が多かった。しかし深部中間層上部、浅部中間層、角質層では、種々の程度に凝集した Tfib を持った細胞や単一角化細胞などは、瀰慢性増生期における場合よりも、むしろ顕著に認められた。粗面小胞体、lysosome などの細胞小器官は、比較的発達しており、ときに大小、不整形の糸粒体をみることもあった (Fig. 20)。浅

部中間層、角質層における Ks と KG の変化は、小乳頭腫の場合とほぼ同様であった (Fig. 20)。glutaraldehyde のみの固定でみられる KG 内部の低電子密度の小円形部分は、さらに縮少し、KG の大部分は高電子密度の基質で占められていた (Fig. 21)。浅部中間層上部、角質層の細胞には、変性した糸粒体、遺残変性した細胞小器官や無構造物質をいれた lysosome 様構造物がみられ、cystic に拡大した細胞間隙の一部にも同様の無構造物質が認められた (Fig. 22)。角質層上部の細胞には lysosome 様構造物はみられず、細胞質は Tfib と低電子密度の線維間物質から成り、細胞膜は肥厚していた (Fig. 22)。

表面増殖期。上皮突起の深部増殖を特徴とし、細胞間隙は拡大していた (Fig. 23)。上皮突起、深部中間層における細胞の超微構造は、乳頭腫のそれと同様、核・細胞質比は大きく、上皮突起の大部分は、きわめて遊離リボゾームに富んだ暗調細胞で占められていた (Fig. 23)。Tfib は比較的少ないが、中間層細胞における Tfib の発達程度が個々の細胞で異なっていた。浅部中間層、角質層における細胞の超微構造は、瀰慢性増生期の後半以後における場合と基本的に変わらなかった。

4 考 案

4・1 病的角化について

舌癌形成過程では、過角化、不全角化、棘融解、異常角化などの種々の病的角化がみられた。異常角化細胞は、瀰慢性増生期の後半以後、常に出現し、とくに乳頭腫では顕著であった。その代表的なものは単一角化細胞で、棘融解のため desmosome は欠如し、細胞質は緊密に充満する多量の凝集した Tfib で占められていた。このような単一角化細胞は、Bowen 病¹⁷⁾、皮膚癌¹⁸⁾などの腫瘍性疾患のみならず、Darier 病¹⁹⁾、Hailey-Hailey 病¹⁹⁾などの非腫瘍性疾患にも認められ、腫瘍性疾患や発癌過程で特異的にみられる細胞ではない。今回の観察からは、Tfib が細胞質の一部に局限したり、Setälä らのいう crown of thorn-like pattern⁷⁾、すなわち強く凝集した Tfib が核周囲に走行した細胞が多く、単一角化細胞は比較的少なかった。このような異常凝集した Tfib を持つ細胞は、単一角化細胞がみられる上記疾患にも認められ、desmosome の欠如を伴わないという点で単一角化細胞とは異なるが、超微構造的には異常角化細胞と考えられている²⁰⁾。異常角化の成り立ちについては、一般に desmosome の障害によって Tfib が desmosome から離断することに起因するとされている¹⁹⁾。この desmosome が障害される原因について、非腫瘍性疾患では、細胞の変性²¹⁾、先天的な desmosome-tonofibril 複合体の機能障害¹⁹⁾によるのに対し、癌形成過程

では、細胞の旺盛な分裂、増殖に伴う desmosome の再形成不全によるものと考えられている⁹⁻¹¹⁾。また後者における異常角化の成り立ちについては、前述した desmosome の再形成不全に加え、分化の程度が個々の細胞で異なること、細胞の代謝能の亢進などに、角化の異常が同時に伴うことも原因としてあげられている⁹⁻¹¹⁾。desmosome は上皮の層構造の維持、角化の遂行に重要な役割を果たしており²²⁾、desmosome が障害されれば、角化形態にも変化が生ずることは容易に想像される。また細胞の増殖性変化を主体とする乳頭腫では、細胞間隙の拡大と共に、desmosome は減少傾向を示し、異常角化は一段と顕著になるわけである。

過角化は瀰慢性増生期に顕著だが、乳頭腫にも認められ、肥厚した角質層には、多数の異常角化細胞、それに不全角化を伴った細胞が重積していた。角質層直下にも凝集した多量の Tfb を持つ浅部中間層の細胞があり、未成熟のまま、細胞が浅部中間層から角質層へと移行したことが示唆される。不全角化は乳頭腫に最も顕著に認められ、角質層細胞は、核、凝集した Tfb、リボゾーム、糸粒体、空胞などをいれていた。不全角化は、細胞の turnover が亢進した尋常性乾癬でも認められ、細胞の成熟速度と turnover time の不均衡によって生じたものとされている²⁵⁾。しかし尋常性乾癬の不全角化部位には、乳頭腫にみられるような Tfb の異常凝集像はみられない²⁵⁾。したがって、乳頭腫における不全角化は、尋常性乾癬の場合と同一の機序でもって説明することはできない。

注目すべきことは、いずれの病的角化細胞でも、角化すれば常に細胞膜が肥厚することである。とくに単一角化細胞では、細胞質に緊密に充満する多量の凝集した Tfb と共に、肥厚した高電子密度の細胞膜がその特徴となっている。このような細胞膜の肥厚も、KG に由来するとは考えられず、その機序は不明であるが、keratinocyte の角化の最終段階で起こる共通の現象といってよいであろう。

以上のように癌形成過程、とくに乳頭腫では、上皮下層の増殖層において、Tfb は比較的減少しているが、細胞の分裂、増殖によって desmosome が障害され、keratinocyte は次第に正常の角化機能を営む能力を失ない、Tfb の異常凝集を主体とする異常角化をはじめ、種々の病的角化を示すようになるものと思われる。また病的角化を伴った角質層細胞は、それ以上の成熟を示すことはないの、癌形成過程では、本質的に keratinocyte の機能、あるいは成熟が障害されていると考えられる。

4.2 keratinosome と keratohyalin granule の変化について

正常上皮では、Ks は KG と共に角化に関係する重要な構造物であり²³⁾、基底層、深部中間層の細胞の増生を主体

とする癌形成過程では、Ks は減少するものと予測されるが、今回の観察から、Ks は減少することではなく、むしろ増加傾向を示すこともあることが明らかにされた。一般に Ks は細胞の turnover が亢進した尋常性乾癬のような疾患では増加するといわれている²⁴⁾。しかし癌形成過程における病的角化の出現とその形態、KG 産成低下の機序などは、尋常性乾癬におけるそれ²⁵⁾とはやや異なり、Ks の増加を単に細胞の turnover の亢進に求めることはできない。創傷治癒の過程で、角質層が形成される以前にすでに多数の Ks が発達しており、Ks が角質層形成に重要な役割を果たしているものと考えられている²⁶⁾。このことから判断すると、癌形成過程では、病的角化した細胞から成る角質層といえども、角質層の形成にあずかるために多数の Ks が発達し、また角質層の形成が促進されることによって、過角化が生じたものと考えることができる。乳頭腫では、Ks は上皮上層の細胞間隙に見いだされることはきわめてまれで、大部分のものは細胞質に散在していた。これは、細胞の上皮上層への移行が早すぎるために、Ks が細胞間隙に移動できないというよりは、むしろ本質的に Ks の細胞間隙への放出障害があると考えた方がよいであろう。細胞質に遺残した Ks は本来の機能²⁷⁾を果たすことができないものと思われ、このようなことから角質層細胞は、正常上皮のそれと同様の性質、機能²⁸⁾を持っているとはとうてい考えられない。

一方 KG の出現頻度は低下し、KG 様核内小体も消失した。また KG 内部の形態にも異常をきたし、glutaraldehyde のみの固定でみられる KG 内の DHD (dense homogeneous deposit)²⁹⁾に相当する明調部分は、次第に縮小する傾向を示した。KG 出現頻度の低下は、細胞の turnover の亢進した尋常性乾癬でも認められるが²⁵⁾、これは、細胞の成熟速度と turnover time の不均衡によって惹起されたもので、Tfb 形成不全による KG 物質沈着の場合がないことも考慮される²⁵⁾。これに対し癌形成過程でみられる多くの細胞は、程度の差こそあれ凝集した Tfb を持っており、KG 物質沈着の場合は確保されている。したがって KG の出現頻度の低下も、尋常性乾癬とまったく同一の機序では説明できない。癌形成過程では、細胞の成熟障害によって、Ks が細胞間隙へ移動できないばかりか、KG の産生能も低下しているものと思われる。

4.3 細胞質ならびに核の変化とそれらの相互関係について

各期に共通する細胞質の特徴的な変化は、遊離リボゾームの増量で、基底層、深部中間層のような分裂、増殖能を有する細胞に顕著であった。このような細胞の核は、核・細胞質比は大で、核輪郭の不整を伴い、核小体も肥大し網

状構造をとるものが多く、核内のクロマチンは不規則に分布して核は明るかった。核、核小体の肥大、核小体の網状構造は、細胞質のリボゾーム合成の場として、核、核小体が活発な活動をしているためで、また核輪郭が不整形を呈するのは、核と細胞質との高分子交換の条件を良くするために、核の表面積を増加させる必要があるからであろう³⁰⁾。一方、核質が明るくみえる場合は、変性の結果として現れる染色質の分散によるそれとの区別が必要であるが、Yasuzumi らのオートラジオグラフィによる検索では、核小体の肥大がみられる場合、核質の明るい方がかえて DNA 合成が活発であるという³¹⁾。このように核の形態は、細胞質における遊離リボゾームの増量、細胞の分裂、増殖に伴う活発な蛋白合成、異常増量して凝集する Tfib の合成に見合った像を示している。

上皮の大部分を占める暗調細胞に交えて、明調細胞が散在することもあった。一般に明暗2型の上皮細胞は、自然発生腫瘍^{32,33)}、実験皮膚癌^{8~12)}に多くみられ、これらの変化は、変性¹¹⁾、neoplastic expression¹²⁾、embryonal type³³⁾などと解釈されている。細胞の明調、暗調は、細胞基質の電子密度と細胞小器官、とくにリボゾームの量的な差異によるもので、暗調細胞がとくに変性したと思われる所見はみられなかった。明調細胞は暗調細胞と比較し、細胞小器官の発達はさほど変らないが、遊離リボゾームの数は広い細胞質の割には少なく、ときに空胞、それに粗面小胞体内腔の軽度の拡大を伴うことがあり、明らかに変性と考えられるものもあった。しかし初期においては明暗2型の細胞が増殖層に混在しており、明調細胞だけが変性した細胞とは必ずしもいえない。また暗調細胞の中には、細胞質のみならず核質までも暗調を呈する細胞があり、細胞が暗調を呈するのは、標本作製時、とくに固定時における組織、細胞の収縮による artifact の可能性も完全には否定できない。いずれにしても明暗2型の細胞の性格について、そのすべてを同一の機序で説明できるかどうかは今後さらに検討しなければならない問題である。

5 結 語

ハムスター舌粘膜に DMBA を塗布し、乳頭腫が形成されるまでの過程を、角化形態の変化を中心に、光顕、電顕的に検索した。

5・1 初期においては、対照例とほとんど変わらず、病的角化はまったく認められなかった。

5・2 慢性増生期、乳頭腫形成期、あるいは表面増殖期では、増殖性細胞から成る上皮下層には、細胞間隙の拡大、desmosome の減少、核の変化、細胞質におけるリボゾームの増加、Tfib の減少、ときにその増量などが認められた。

また上皮上層を中心に、過角化、不全角化、棘融解、異常角化などの病的角化がみられた。これらの変化は、とくに乳頭腫において顕著であった。

5・3 異常角化細胞には、異常凝集、偏在、走行した Tfib を持つ細胞と棘融解性の単一角化細胞の二種類のものがあつた。異常角化は、細胞の分裂、増殖に伴う desmosome の再形成不全に起因する desmosome の障害と上皮の組織構築の破綻によって生じたものと考えられた。

5・4 過角化によって肥厚した角質層の大部分は、異常角化細胞で占められていたが、乳頭腫のそれには不全角化した細胞も認められた。過角化は、角質層細胞の形成促進によって、不全角化は細胞が未成熟のまま、角質層へと移行することによって生じたものと思われた。

5・5 病的角化を伴った角質層細胞や単一角化細胞の細胞膜は、常に肥厚していた。細胞膜の肥厚は、keratinocyte の角化の最終段階で生ずる共通の現象と考えられた。

5・6 Ks は増加傾向を示すが、乳頭腫では、細胞間隙にみられることはなく、細胞質に遺残していた。KG は次第に減少し、glutaraldehyde のみの固定でみられる内部の明調部分は縮小した。

5・7 癌形成過程、とくに乳頭腫にみられる病的角化の機序は、非腫瘍性疾患におけるそれとはかなり異なり、乳頭腫では、本質的に keratinocyte の成熟が障害されているものと考えられた。

文 献

1. 小野江為則, 布施裕輔: アゾ色素肝癌の発生. 細胞 2, 25-34 (1970).
2. Onoé, T., Kaneko, A., Dempo, K., Ogawa, K. and Minase, T.: α -Fetoprotein and early histological changes of hepatic tissue in DAB-hepatocarcinogenesis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 259, 168-180 (1975).
3. Kaneko, A., Dempo, K., Yoshida, Y., Chisaka, N. and Onoé, T.: Deviation in esterase isozyme pattern during early stage of hepatocarcinogenesis by 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. Cancer Res. 34, 1816-1821 (1974).
4. Ogawa, K., Minase, T. and Onoé, T.: Demonstration of glucose-6-phosphatase activity in "oval cells" and the significance of oval cells in azo-dye carcinogenesis. Cancer Res. 34, 3379-3386 (1974).
5. Dempo, K., Chisaka, N., Yoshida, Y., Kaneko, A. and Onoé, T.: Immunofluorescent study on α -fetoprotein producing cells in the early stage of 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene carcinogenesis. Cancer Res. 35, 1282-1287 (1975).

6. 横山繁昭, 金子愛子, 伝法公麿, 千坂礼靖, 森 道夫: 3'-Methyl-4-Dimethylaminoazobenzene によって誘発したラット肝癌の Butyrylcholinesterase 活性についての組織化学的および細胞化学的研究. 札幌医誌 **47**, 309-320 (1978).
7. Setälä, K., Merenmies, L., Erkkinkanen, E., Nyholm, M. and Stjernvall, L.: Mechanism of experimental tumorigenesis. VI. Ultrastructural alteration in mouse epidermis caused by locally applied carcinogen and Dipole-type tumor promoter. J. Natl. Cancer Inst. **25**, 1155-1189 (1960).
8. Lupulescu, A. and Pinkus, H.: Electron microscopic observations on rat epidermis during experimental carcinogenesis. Oncology **33**, 24-28 (1976).
9. 尾崎鉄也: 20-Methylcholanthrene によるマウス皮膚癌の発生過程の電子顕微鏡的研究. 札幌医誌 **24**, 115-133 (1963).
10. 西東敏雄: 20-Methylcholanthrene 皮膚癌発生過程の超微構造的研究, 特にその早期変化について. 札幌医誌 **34**, 302-320 (1968).
11. 矢代昭夫: 実験的皮膚癌の電子顕微鏡的研究. 昭医誌 **34**, 601-626 (1974).
12. Raick, A. N.: Cell differentiation and tumor-promoting action in skin carcinogenesis. Cancer Res. **34**, 2915-2925 (1974).
13. 小田島哲世, 賀来 亨: 実験的ハムスター舌癌形成過程の超微形態学的研究. I. 正常舌粘膜上皮の超微構造: 特に角化について. 札幌医誌 **47**, 225-243 (1978).
14. Fujita, K., Kaku, T., Sasaki, M. and Onoé, T.: Experimental production of lingual carcinomas in hamsters by local application of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene. J. Dent. Res. **52**, 327-332 (1973).
15. 藤田浄秀, 賀来 亨, 佐々木元賢, 小野江為則: 舌癌の実験的形成に関する研究. 第2編 舌癌形成過程の組織学的研究. 口科誌 **22**, 64-75 (1973).
16. 藤田浄秀, 賀来 亨, 小田島哲世, 早津良和, 鈴木明人, 玄番涼一, 佐々木元賢: 舌癌の実験的形成に関する研究. 第11編 舌側縁中部における発癌剤の単純塗布による舌癌形成過程の組織学的研究. 日口外誌 **22**, 259-268 (1976).
17. Seiji, M. and Mizuno, F.: Electron microscopic study of Bowen's disease. Arch. Derm. **99**, 3-16 (1969).
18. 宮田千珈子: 偽腺性有棘細胞癌 (Pseudoglandular Squamous Cell Carcinoma) の実験的研究. —とくに本症の起源ならびに腺様構造の本態と形成過程について—. 日皮会誌 **85**, 235-249 (1975).
19. Wilgram, G. F. and Weinstock, A.: Advances in genetic dermatology. Dyskeratosis, acantholysis, and hyperkeratosis with a note on the specific role of desmosomes and keratinosomes in the formation of the horny layer. Arch. Derm. **94**, 456-479 (1966).
20. Wilgram, G. F., Caulfield, J. B. and Lever, W. F.: An electron microscopic study of acantholysis in pemphigus vulgaris. J. Invest. Derm. **36**, 373-382 (1961).
21. 松本厚生: 帯状疱疹の電子顕微鏡学的研究. 西日皮膚 **34**, 18-36 (1972).
22. Matoltsy, A. G.: Desmosomes, filaments, and keratohyaline granules: their role in the stabilization and keratinization of the epidermis. J. Invest. Derm. **65**, 127-142 (1975).
23. Fukuyama, K., Inoue, N., Suzuki, H. and Epstein, W. L.: Keratinization. Int. J. Derm. **15**, 473-489 (1976).
24. Wilgram, G. F.: Das Keratinosomen: ein Faktor im Verhornungsprozeß der Haut. Hautarzt **16**, 377-379 (1965).
25. 広根孝衛, 荒井邦夫, 江竜喜史, 西部武嗣, 川田宗弘: 皮膚の角化の病態生理. —電子顕微鏡的観察—. 日医会誌 **61**, 375-390 (1969).
26. Krawczyk, W. and Wilgram, G. F.: The synthesis of keratinosomes during epidermal wound healing. J. Invest. Derm. **64**, 263-267 (1975).
27. Hashimoto, K.: Cementsome, a new interpretation of the membrane-coating granule. Arch. Derm. Forsch. **240**, 349-364 (1971).
28. Brody, I.: Intercellular space in normal human stratum corneum. Nature **209**, 472-476 (1966).
29. Fukuyama, K., Wier, A. and Epstein, W. L.: Dense homogeneous deposits of keratohyalin granules in newborn rat epidermis. J. Ultrast. Res. **38**, 16-26 (1972).
30. 安澄権八郎: 核の電顕像の診断学的価値. 細胞 **6**, 2-19 (1974).
31. Yasuzumi, G., Sugihara, R., Ito, N., Konishi, Y. and Hiasa, Y.: Fine structure of nuclei as revealed by electron microscopy. VII. Hyperplastic liver nodules in rat induced by 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene, 2-fluorenylacetamide and DL-ethionine. Exp. Cell Res. **63**, 83-95 (1970).
32. Onoé, T.: Electron microscopic studies of human carcinoma. J. Electronmicroscopy **11**, 70-84 (1962).
33. Brody, I.: Contributions to the histogenesis of basal cell carcinoma. J. Ultrast. Res. **33**, 60-79 (1970).

Explanation of figures

Figs. 1-4 Light micrographs of portions of epithelium from the papillomatous proliferation stage (figures 1-3) and the surface proliferation stage (figure 4). Specimens were fixed with formalin, embedded in paraffin and stained with hematoxylin and eosin (H. E.).

Fig. 1 Small protuberance of mucosa. $\times 30$.

Fig. 2 Small papillomatous lesion (small papilloma). $\times 100$.

Fig. 3 Large papillomatous lesion (large papilloma). $\times 50$.

Fig. 4 Lesion in the surface proliferation stage. Note the remarkable downward growth of epithelium. $\times 100$.

Fig. 5 Electron micrograph of lingual epithelium from the initial stage. Note the duplication of lamina densa (arrows). $\times 7,700$.

Figs. 6-14 Electron micrographs of portions of epithelium from the diffuse proliferation stage. Figures 6-8, 12 and 13 are from the first stage and figures 9-11, 14 are from the later one.

Fig. 6 Intercellular spaces in the basal and proxymal intermediate layers are greatly dilated. Dc shows dark cell, Cc: clear cell. $\times 11,100$.

Fig. 7 Tonofibrils (Tfib) are slightly aggregated in the perinuclear cytoplasm of the basal and proxymal intermediate cells. N shows nucleus. $\times 5,700$.

Fig. 8 Proxymal intermediate cell contains many mitochondria (Mi), ribosomes, developed Golgi apparatus (Go) and slightly aggregated tonofibrils (Tfib). $\times 11,300$.

Fig. 9 Proxymal intermediate cell contains strikingly aggregated tonofibrils which form the "crown of thorn-like pattern". The nucleus is irregular in shape and contains prominent nucleolonema (arrow) and clear nucleoplasm. $\times 8,300$.

Fig. 10 High magnification of a part of aggregated tonofibrils. Each filament which constitutes aggregated tonofibrils is discernible. $\times 11,800$.

Fig. 11 A cell of individual keratinization. The cell membrane is thickened. It contains a degenerated nucleus (N), aggregated tonofibrils and many small vacuoles. $\times 5,900$.

Fig. 12 Epithelium in the distal intermediate layer (IM) and horny layer (H) are similar to that in normal control epithelium. Intranuclear small dense granules are indicated by small arrows and keratohyalin granules by large arrows. $\times 11,800$.

Fig. 13 Many keratinosomes are seen along the cell membrane of the distal intermediate cells. $\times 21,200$.

Fig. 14 Some keratohyalin granules (arrows) are located in close association to aggregated tonofibrils. Horny cells (H) are filled with aggregated tonofibrils. $\times 7,600$.

Figs. 15-22 Electron micrographs of some lesions from the papillomatous proliferation stage. Figures 15-19 are from small papillomas, and figures 20-22 are from large papillomas.

Fig. 15 Irregularly shaped nuclei and increased nucleo-cytoplasmic ratio are noted in the basal and proxymal intermediate layers as well as the increase in the size and number of nucleolus. Note the dilatation of intercellular spaces and scanty desmosomes. $\times 5,300$.

Fig. 16 Deep invagination of plasma membrane is observed in a proxymal intermediate cell. $\times 18,800$.

Fig. 17 A clear intermediate cell (Cc) is seen among dark intermediate cells (Dc). $\times 4,200$.

- Fig. 18** High magnification of a keratohyalin granule in a specimen fixed with glutaraldehyde alone. Arrow shows electron opaque area of it. $\times 27,600$.
- Fig. 19** Keratinosomes are diffusely distributed in the cytoplasm of the distal intermediate cells (IM). A horny cell (H) in the lower horny layer contains abundant aggregated tonofibrils and numerous ribosomes. $\times 13,200$.
- Fig. 20** Intermediate cells contain scarce tonofibrils, but many organelles. $\times 9,900$.
- Fig. 21** High magnification of a keratohyalin granule in a specimen fixed with glutaraldehyde alone. Electron opaque areas are greatly reduced. $\times 25,800$.
- Fig. 22** Distal intermediate cells (IM) contain many keratinosomes, while horny cells (H) contain only lysosome-like bodies. Cell membranes of horny cells are thickened. $\times 15,600$.
- Fig. 23** Low power view of epithelial pads from the surface proliferation stage. Note similarity of ultrastructure to that shown in figure 15. $\times 2,100$.















